

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

091868129

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

DE 99/3768

#3
SDELOI
R. Talia

REC'D 19 JAN 2000

WIPO

PCT

Bescheinigung

Die Leica Microsystems Wetzlar GmbH in Wetzlar/Deutschland hat eine Patent-
anmeldung unter der Bezeichnung

„Verfahren zur individuellen Anpassung von Anregungsintensitäten
bei einem Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop und Multiband-
Fluoreszenz-Mikroskop zur Durchführung des Verfahrens“

am 17. Dezember 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol
G 02 B 21/16 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 15. Dezember 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Joost

Aktenzeichen: 198 58 206.4

**Verfahren zur individuellen Anpassung von Anregungsintensitäten bei
einem Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop und Multiband-Fluoreszenz-
Mikroskop zur Durchführung des Verfahrens**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur individuellen Anpassung von Anregungsintensitäten bei einem Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop und ein Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop zur Durchführung des Verfahrens entsprechend den Merkmalen des Oberbegriffs der unabhängigen Ansprüche.

Bei der Multiband-Fluoreszenz-Mikroskopie steht der Anwender häufig vor dem Problem, daß die verschiedenen Fluoreszenzbänder im Mikroskopbild unterschiedliche Intensitäten aufweisen und nicht gleichmäßig sichtbar sind. Die Ursache liegt häufig in den unterschiedlichen Anregungsintensitäten im Beleuchtungsstrahlengang oder auch in der unterschiedlichen Sperrung der Fluoreszenzintensitäten durch ein Sperrfilter im Abbildungsstrahlengang. Auch unterschiedliche Konzentrationen der Fluoreszenz-Farbstoffe für die verschiedenen Anregungsbänder schon beim Anfärben der zu betrachtenden Objekte oder das allmählichen Ausbleichen der Farbstoffe, das sogenannte Fading, führen zu unterschiedlichen Intensitäten der Fluoreszenzbänder im Mikroskopbild. Die unterschiedlichen Intensitäten der Fluoreszenzbänder erweisen sich insbesondere dann als problematisch, wenn das Mikroskop-Bild fotografisch festgehalten werden soll. Dann wird der intensitätsschwache Anteil des Fluoreszenzlichts auf dem Foto zu schwach wiedergegeben oder ist gar nicht sichtbar. Nur möglichst gleiche Intensitäten der Fluoreszenzbänder ermöglichen einwandfreie Fotos des Mikroskop-Bildes.

Die US 5,371,624 gibt ein Fluoreszenz-Mikroskop mit nur zwei Anregungsbändern an, in dem die Intensitäten der beiden Anregungsbänder abwechselnd beeinflusst werden können. Es enthält einen Beleuchtungsstrahlengang mit einer Lichtquelle und einem Anregungsfilter, das aus dem Licht der Licht-

quelle mehrere Anregungsbänder unterschiedlicher Lichtwellenlängen erzeugt. Ferner weist es einen Teilerspiegel, ein Ausgangsfilter (auch als Sperrfilter oder Emissionsfilter bezeichnet) für das Fluoreszenzlicht sowie ein Filterelement zur Beeinflussung der Intensitäten der Anregungsbänder auf.

- 5 Das Filterelement kann durch Kippen gegenüber der optischen Achse stufenlos zwischen zwei Endstellungen mit zwei fest vorgegebenen Werten der Transmissionsgrade des einen bzw. des anderen Anregungsbandes umgeschaltet werden. In der einen Endstellung dämpft es nur das erste Anregungsband, in der anderen Endstellung nur das zweite Anregungsband und
10 zwischen den beiden Endstellungen keines der beiden Anregungsbänder. Eine Absenkung des Transmissionsgrads des jeweiligen Anregungsbandes ist nur bis zu dem fest vorgegebenen Wert möglich. Eine Variation zwischen einer maximalen Transmission und einem Wert Null, d.h. bis zu einer vollständigen Unterdrückung eines der beiden Anregungsbänder, ist jedoch nicht
15 möglich. Außerdem können nur zwei Anregungsbänder beeinflusst werden.

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur individuellen Anpassung von Anregungsintensitäten bei einem Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop und ein Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop zur Durchführung des Verfahrens anzugeben, in welchen wahlweise eines oder mehrere der Anregungsbänder entweder teilweise oder auch vollständig ausgefiltert werden
20 können. Dazu soll der Transmissionsgrad für jedes Anregungsband mit einfachen Mitteln stufenlos einstellbar sein.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die kennzeichnenden Merkmale der unabhängigen Ansprüche gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben
25 sich aus den Merkmalen der Unteransprüche.

Das erfindungsgemäße Verfahren geht von einem bekannten Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop aus, in dem in einem Beleuchtungstrahlengang aus dem Licht einer Lichtquelle mithilfe eines Anregungsfilters mehrere Anregungsbänder unterschiedlicher Lichtwellenlängen erzeugt werden. Die Anregungsbänder beleuchten ein mit Fluoreszenz-Farbstoffen präpariertes Fluo-
30

reszenz-Objekt und werden von diesem in frequenzverschobene Fluoreszenzbänder umgesetzt.

Erfindungsgemäß werden im Mikroskopbild zunächst die Fluoreszenz-Intensitäten der einzelnen Fluoreszenzbänder bestimmt und mit vorher festgelegten Intensitäts-Sollwerten verglichen. Die Bestimmung der Fluoreszenz-Intensitäten kann beispielsweise visuell oder mithilfe eines Intensitätsmessers vorgenommen werden. Dieser kann beispielsweise aus einer Video- oder CCD-Kamera mit nachgeschaltetem Bildanalyse-System bestehen.

Dabei kann für jedes Fluoreszenzband ein anderer Intensitäts-Sollwert festgelegt sein. In der Praxis orientieren sich die Sollwerte aber an konkreten Aufgabenstellungen des Mikroskop-Anwenders. Soll beispielsweise das Mikroskop-Bild entweder fotografisch oder mit einer Videokamera dokumentiert werden und dabei jedes Fluoreszenzband im Foto oder im Video-Bild gleich hell wiedergegeben werden, hängt die Höhe der Sollwerte von der spektralen Empfindlichkeit des Films bzw. der Kamera ab. Daher muß deren spektrale Empfindlichkeit bei der Festlegung der Sollwerte für die verschiedenen Anregungsbänder berücksichtigt werden.

So müssen die gewünschten Sollwerte alle gleich - und zwar gleich der niedrigsten Fluoreszenz-Intensität - sein, sofern der Film oder die Kamera alle Spektralfarben mit gleicher Intensität wiedergibt. Ist die spektrale Empfindlichkeit der Videokamera oder des Films jedoch nicht konstant, so müssen entsprechend unterschiedliche Sollwerte für die verschiedenen Fluoreszenzbänder festgelegt werden, um die Fluoreszenzbänder gleich hell wiedergeben zu können.

Sollen andererseits bestimmte Fluoreszenzbänder auf dem Foto oder dem Videobild nicht erscheinen, also ausgeblendet werden, so müssen für diese die Sollwerte gleich Null sein. Dabei erweist es sich als günstig, wenn zusätzlich für die nicht ausgeblendeten Fluoreszenzbänder die Sollwerte gleich der niedrigsten ihrer Intensitäten sind. Dann erscheinen diese Fluoreszenzbänder alle gleich hell.

Für jedes Anregungsband, das einer von den Sollwerten abweichenden Fluoreszenz-Intensität zugeordnet ist, wird erfindungsgemäß ein auf das betreffende Anregungsband abgestimmtes selektives Filter in den Beleuchtungsstrahlengang gebracht. Sein spektraler Transmissionsverlauf ist so ausgelegt, daß ausschließlich die Intensität des betreffenden Anregungsbandes reduziert wird, die übrigen Spektralbereiche aber ungehindert durchgelassen werden.

In einem erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist ein Filterschieber-Satz aus mehreren einzeln verschiebbaren Filterschiebern dicht neben der Aperturblenden-ebene senkrecht in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt.

Der Aufbau der Filterschieber hängt von der Anzahl der verschiedenen Anregungsbänder des Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops ab. Bei einer Anzahl von n Anregungsbändern besitzt jeder Filterschieber n auf die Anregungsbänder abgestimmte, selektive Filter, die Flächenbereiche mit hohen und niedrigen Transmissionsgraden aufweisen.

Die unterschiedlichen Transmissionsgrade werden erzielt, indem nur bestimmte Flächenanteile des Strahlquerschnitts mit separaten Filter-Flächenelementen belegt werden. Dabei wird auf eine möglichst gleichmäßige Flächenbeleuchtung des Strahlquerschnitts geachtet, so daß keine einseitige Abschattung des Strahlquerschnitts und damit auch keine einseitige Ausleuchtung der Pupillen erfolgt. Dadurch wird eine schiefe Beleuchtung und damit ein laterales Wandern der Bildpunkte beim Fokussieren vermieden.

Die Filter müssen unabhängig voneinander einzeln oder kombiniert mit dem gewünschten Flächenbereich bzw. der gewünschten Transmission in den Beleuchtungsstrahlengang einfügbar sein. Dabei müssen bei n Anregungsbändern maximal $n-1$ Filter miteinander kombinierbar, d.h. gleichzeitig in den Beleuchtungsstrahlengang einfügbar, sein. Dies ist ausreichend, da nie alle Anregungsbänder gleichzeitig gedämpft werden müssen, weil in der Regel ein Anregungsband den Intensitäts-Sollwert liefert und unverändert bleibt. Ebenso

müssen nicht alle Anregungsbänder gleichzeitig ausgelöscht werden, da dies einem Abschalten der Beleuchtung gleichkommt.

Um die erforderlichen Kombinationen aus $n-1$ Filtern zu erzielen, sind in einer vorteilhaften Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops mit n Anregungsbändern auf $n-1$ Schiebe-Ebenen $n-1$ einzeln verschiebbare Filterschieber angeordnet, die dicht parallel neben der Aperturblendenebene in geringem Abstand zueinander liegen und in Kombination wirksam sind. Mit jedem Filterschieber kann jeweils ein Filter für ein Anregungsband passend eingestellt werden, so daß insgesamt maximal $n-1$ Anregungsbänder (eines weniger als die maximale Anzahl) gezielt gedämpft oder ausgelöscht werden können.

Für zwei Anregungsbänder ist es ausreichend, wenn die beiden erforderlichen Filter in einer einzigen Schiebe-Ebene ($n-1=1$) angeordnet sind, da entweder nur das eine oder nur das andere Filter in den Beleuchtungsstrahlengang eingeschoben werden muß. Daher wird ein Filterschieber-Satz zur Beeinflussung von zwei Anregungsbändern vorzugsweise einteilig, also mit nur einem Filterschieber, aufgebaut. Für mehr als zwei Anregungsbänder muß jedoch ein entsprechend mehrteiliger Filterschieber-Satz mit $n-1$ einzeln verschiebbaren Filterschiebern vorgesehen werden.

Außer den selektiven Filtern für die verschiedenen Anregungsbänder weist jeder Filterschieber mindestens eine freie Öffnung mit dem Strahldurchmesser des Beleuchtungsstrahlengangs auf. Dabei ist neben jedem Filter eine freie Öffnung angeordnet. Je nach Ausführungsform können die Filter auch direkt um eine einzige freie Öffnung gruppiert sein. Der Transmissionsgrad der Filter nimmt in Verschieberichtung mit zunehmendem Abstand von der freien Öffnung ab. Jedes Filter weist dabei einen Flächenbereich mit dem geringsten Transmissionsgrad und einem Mindestdurchmesser gleich dem Strahldurchmesser x auf. Wenn dieser Flächenbereich in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht ist, wird das zugehörige Anregungsband maximal, d.h. auf den Wert Null, gedämpft.

Durch richtiges Positionieren jedes einzelnen Filters im Beleuchtungsstrahlengang wird der auf den Beleuchtungsstrahlengang wirksame Transmissionsgrad individuell genau so eingestellt, daß durch Dämpfung des dem Filter zugeordneten Anregungsbandes die daraus resultierende Fluoreszenz-

5 Intensität mit ihrem Intensitäts-Sollwert übereinstimmt. Zur Durchführung dieses Verfahrensschritts sind jedem Filterschieber separate Verstellmittel zugeordnet, die durch Verschieben und/oder Drehen des Filterschiebers das vollständige oder teilweise Überdecken des Beleuchtungsstrahlengangs mit dem geeigneten Flächenbereich des Filterschiebers bewirken. So kann wahlweise
10 die freie Öffnung oder eines oder mehrere der Filter oder Kombinationen aus Filterflächen und der freien Öffnung in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht werden. Wenn dieser letzte Verfahrensschritt für alle Filter und damit alle Anregungsbänder vorgenommen wurde, stimmen alle Fluoreszenz-Intensitäten mit ihren Sollwerten überein.

15 Auch nach optimaler Einstellung der Fluoreszenz-Intensitäten durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens mithilfe eines angegebenen Multi-band-Fluoreszenz-Mikroskops werden nach einiger Zeit wieder Abweichungen der Fluoreszenz-Intensitäten von den Sollwerten auftreten. Dies liegt daran, daß die verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffe für die verschiedenen Anregungsbänder unterschiedlich schnell verblassen, d.h. sie zeigen ein spezifisches Fading.
20

Daher werden in einer vorteilhaften Ausführung des Verfahrens die zeitlichen Veränderungen der Fluoreszenz-Intensitäten fortlaufend bestimmt. Die im Beleuchtungsstrahlengang wirksamen Transmissionsgrade der Filter werden
25 dann wiederholt in bestimmten zeitlichen Abständen so eingestellt, daß die ~~Fluoreszenz-Intensitäten stets wieder mit ihren Sollwerten zur Übereinstimmung~~ gebracht werden.

Eine besonders vorteilhafte Ausgestaltung des Verfahrens gestattet einen automatischen Fading-Ausgleich. Dazu werden die zeitlichen Veränderungen
30 der Fluoreszenz-Intensitäten automatisch fortlaufend bestimmt. Dazu kann beispielsweise das Mikroskop-Bild automatisch fortlaufend mit einer Video-

Kamera aufgenommen und die darin enthaltenen Fluoreszenz-Intensitäten mit einem Bildanalyse-System bestimmt und mit den vorgegebenen Sollwerten verglichen werden.

5 Dann werden die Transmissionsgrade der Filter automatisch fortlaufend verändert und angepaßt, so daß die Fluoreszenz-Intensitäten stets auf den Intensitäts-Sollwerten gehalten werden. Dazu können beispielsweise motorisch betriebene Verstellmittel eingesetzt werden. Die Ansteuerung der Motoren und Regelung der Fluoreszenz-Intensitäten auf die Sollwerte kann durch eine Elektronik und einen Rechner erfolgen, dem die Signale der Videokamera
10 bzw. des Bildanalyse-Systems zugeführt werden.

Die Erfindung wird im folgenden anhand der schematischen Zeichnung näher erläutert. Es zeigen :

- Fig. 1** : einen Strahlengang eines erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops;
- 15 **Fig. 2a-d** : verschiedene Ausgestaltungen eines Filterschiebers für ein Zweiband-Fluoreszenz-Mikroskop;
- Fig. 2e** : den spektralen Transmissionsverlauf der Anregungsbänder und der zugeordneten Filter eines Filterschiebers für ein Zweiband-Fluoreszenz-Mikroskop;
- 20 **Fig. 3a-c** : verschiedene Ausgestaltungen eines Filterschiebers für einen zweiteiligen Filterschieber-Satz eines erfindungsgemäßen Dreiband-Fluoreszenz-Mikroskops;
- Fig. 3d** : den spektralen Transmissionsverlauf der Anregungsbänder und der zugeordneten Filter eines Filterschiebers für ein Dreiband-Fluoreszenz-Mikroskop;
- 25 **Fig. 4a-b** : verschiedene Ausgestaltungen eines Filterschiebers für einen dreiteiligen Filterschieber-Satz eines erfindungsgemäßen Vierband-Fluoreszenz-Mikroskops;
- Fig. 4c** : den spektralen Transmissionsverlauf der Anregungsbänder und der zugeordneten Filter eines Filterschiebers für ein Vierband-Fluoreszenz-Mikroskops;
- 30

Fig. 1 zeigt einen Strahlengang eines erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Von einer Lichtquelle 1 geht ein Beleuchtungsstrahlengang mit einer optischen Achse 2 aus, in dem nacheinander ein Kollektor 3, ein erstes Linsenglied 4, eine Aperturblende 5, ein zweites Linsenglied 6, eine Leuchtfeldblende 7, ein drittes Linsenglied 8 und ein Anregungsfilter 9 zur Erzeugung der Anregungsbänder angeordnet sind. Der Beleuchtungsstrahlengang wird an einem Strahlteiler 10 zu einem Objektiv 11 umgelenkt. Er passiert das Objektiv 11 und erreicht ein Fluoreszenz-Objekt 12, das auf einen Objektisch 13 aufgelegt ist.

Die von dem Anregungsfilter 9 erzeugten Anregungsbänder im Beleuchtungsstrahlengang werden durch Fluoreszenz-Farbstoffe, die in das Fluoreszenz-Objekt 12 eingebracht wurden, in Fluoreszenzbänder umgesetzt und diese von dem Fluoreszenz-Objekt 12 frequenzverschoben emittiert. Dieses Fluoreszenzlicht durchläuft das Objektiv 11, den Strahlteiler 10, einen Ausgangsfilter 14, eine Tubuslinse 15 und erreicht eine Zwischenbildebene 16. Das hier erzeugte Zwischenbild kann von einem Mikroskop-Anwender mit einem Okular 17 betrachtet werden. Über einen TV-Ausgang wird das Zwischenbild zusätzlich auf eine Videokamera 18 mit nachgeschaltetem Bildanalyse-System 19 abgebildet. Mit diesem Aufbau können sowohl visuell über das Okular 17 oder mithilfe des Bildanalyse-Systems 19 die Fluoreszenz-Intensitäten der einzelnen Fluoreszenzbänder im Mikroskopbild bestimmt und mit Intensitäts-Sollwerten größer oder gleich Null verglichen werden.

Zur Dämpfung der Anregungsbänder ist erfindungsgemäß ein Filterschiebersatz 20, in diesem Beispiel bestehend aus zwei Filterschiebern 21a und 21b, senkrecht zur optischen Achse 2 des Beleuchtungsstrahlengangs dicht neben, d.h. hinter bzw. vor, der Aperturblendenebene 24 in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht. Auf jedem Filterschieber 21a, 21b sind eine freie Öffnung 22 und daneben mehrere auf die Anregungsbänder abgestimmte, selektive Filter 23 angeordnet. Durch eine möglichst enge Anordnung der Filterschieber 21a, 21b wird erreicht, daß die Filter 23 möglichst dicht neben der

Aperturblendenebene 24 liegen. Dadurch wird sichergestellt, daß die eingeschobenen Filterschieber 21a, 21b nicht im Bild sichtbar werden. Ein weiterer Vorteil ist, daß hier die geringste Strahlaufweitung auftritt, so daß die Flächen der Filter 23 möglichst klein gehalten werden können.

- 5 Erfindungsgemäß sind jedem Filterschieber Verstellmittel zugeordnet. Dabei sind in preiswerteren Ausführungsformen auch Verstellmittel mit manueller Verstellmöglichkeit einsetzbar. Motorische Verstellmittel sind zwar teurer, erlauben jedoch eine Automatisierung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

10 In dem hier dargestellten Ausführungsbeispiel sind als Verstellmittel für die Filterschieber 21a, 21b zwei Motoren 25a, 25b angeordnet, welche die Filterschieber 21a, 21b parallel zur Aperturblendenebene 24 verschieben und/oder drehen können. Mittels der Motoren 25a, 25b kann von dem jeweils zugeordneten Filterschieber 21a bzw. 21b entweder die freie Öffnung 22 oder ein selektives Filter 23 oder eine Kombination aus beiden in den Beleuchtungsstrahlengang 15 eingebracht werden. Die Motoren 25a, 25b werden von einer Steuerelektronik 26 angesteuert, die ihr Eingangssignal von dem Bildanalyse-System 19 erhält.

20 Das Bildanalyse-System 19 ermittelt aus dem Kamera-Signal die Abweichung der Fluoreszenz-Intensitäten von ihren Sollwerten. Dann werden diejenigen Anregungsbänder, welche die Sollwert-Abweichungen verursachen, bestimmt und jedem dieser Anregungsbänder wird zur Dämpfung einer der Filterschieber 21a, 21b zugeordnet. In dem dargestellten Beispiel können somit zwei Anregungsbänder vollständig, also auf den Wert Null, oder auch teilweise gedämpft werden. Für jeden Filterschieber 21a, 21b wird ein Ansteuersignal für 25 die zugehörigen Motoren 25a, 25b erzeugt. Jeder Filterschieber 21a, 21b wird mittels des zugehörigen Motors 25a, 25b stufenlos so verschoben, daß ein auf das zugeordnete Anregungsband selektiv wirksames Filter 23 in den Beleuchtungsstrahlengang gebracht wird. Dann wird der Filterschieber 21a bzw. 21b weiter verschoben, bis ein Flächenbereich des eingefügten Filters 23 mit 30 einem solchen Transmissionsgrad im Beleuchtungsstrahlengang ist, durch den das zugeordnete Anregungsband auf den Intensitäts-Sollwert gedämpft

wird. Auf diese Weise werden alle Anregungsbänder auf ihre Intensitäts-Sollwerte eingestellt.

Nachfolgend werden verschiedene Ausgestaltungen des Filterschieber-Satzes 20 bzw. der Filterschieber 21 und die dazugehörigen spektralen Transmissionsverläufe der darauf angeordneten Filter erläutert.

In **Fig. 2a** ist ein Filterschieber 21 für ein erfindungsgemäßes Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop mit zwei Anregungsbändern A und D dargestellt. Auf einer rechteckigen Glasplatte 27 sind ein Langpaß-Filter 29 zur Intensitäts-Reduzierung des kurzwelligen Anregungsbandes A und ein Kurzpaß-Filter 28 zur Intensitäts-Reduzierung des langwelligen Anregungsbandes D als unterschiedliche Aufdampfschichten aufgebracht. Sie befinden sich an den Enden der Glasplatte 27, dazwischen liegt in der Mitte des Filterschiebers 21 die freie Öffnung 22. Deren Querschnitt ist gleich dem Strahldurchmesser x in der Aperturblende 5 des Beleuchtungsstrahlengangs. Durch hier nicht dargestellte Verstellmittel kann der Filterschieber 21 in Längsrichtung in beiden Richtungen parallel zur Aperturblendenebene 24 stufenlos verschoben werden. Die Bewegung ist durch einen Doppelpfeil angedeutet.

Das Kurzpaß-Filter 28 und das Langpaß-Filter 29 sind in dieser Ausführung jeweils als zusammenhängende Aufdampfschicht aufgebracht. Die Transmission der beiden Filter 28, 29 ist direkt neben der freien Öffnung 22 am größten und nimmt mit dem Abstand von der freien Öffnung 22 ab. Dazu ist neben der freien Öffnung 22 der Filterschieber 21 nicht vollflächig mit den Filtern 28, 29 belegt, sondern der Anteil der Filterflächen nimmt von der freien Öffnung 22 zu den Enden des Filterschiebers 21 zu.

So bilden die Aufdampfschichten an den Enden des Filterschiebers 21 ein Rechteck mit einer Mindestkantenlänge gleich dem Strahldurchmesser x . Wenn diese aufgedampfte Rechteck-Fläche den Beleuchtungsstrahlengang vollflächig abdeckt, ist damit der geringste prozentuale Transmissionsgrad eingestellt und das zugehörige Anregungsband wird vollständig, also auf den Wert Null, gedämpft. An die aufgedampfte Rechteck-Fläche grenzt die Basis

einer aufgedampften Dreieck-Fläche, dessen gegenüberliegende Ecke gegen die freie Öffnung 22 weist.

Durch die aufgedampften Dreieck-Flächen, die den Strahldurchmesser stets nur anteilig überdecken, nimmt der Transmissionsgrad des Kurzpaß-Filters 28 und des Langpaß-Filters 29 jeweils in Verschieberichtung von der freien Öffnung 22 zu den Enden des Filterschiebers 21 ab. Durch Einfügen eines beliebigen Flächenanteils des Kurzpaß-Filters 28 oder des Langpaß-Filters 29 läßt sich jeder gewünschte Transmissionsgrad der Filter 28, 29 im Beleuchtungsstrahlengang realisieren und damit das eine oder das andere Anregungsband beliebig abschwächen oder ausblenden.

In **Fig. 2b** ist ebenfalls ein Filterschieber 21 für ein erfindungsgemäßes Multi-band-Fluoreszenz-Mikroskop mit zwei Anregungsbändern A und D dargestellt. Auf einer rechteckigen Glasplatte 27 sind ein Kurzpaß-Filter 28 zur Filterung des langwelligen Anregungsbandes A und ein Langpaß-Filter 29 zur Filterung des kurzwelligen Anregungsbandes D als unterschiedliche Aufdampfschichten aufgebracht.

Auch hier weisen, wie in **Fig. 2a**, die Aufdampfschichten in Richtung der freien Öffnung 22 eine dreieckige Kontur auf. Allerdings sind hier die Dreiecke jeweils nicht als zusammenhängende Fläche, sondern als kleine, gleich große Flächenelemente 30 aufgedampft. Dadurch ergibt sich für die beiden Filter 28, 29 ein längerer Verstellbereich mit höheren Transmissionen. An den Enden des Filterschiebers 21 bilden die Aufdampfschichten ein Rechteck mit einer Mindestkantenlänge gleich dem Strahldurchmesser x und damit einen Bereich der geringsten Transmission, mit dem das zugeordnete Anregungsband auf Null gedämpft werden kann.

In **Fig. 2c** ist ein weiterer Filterschieber 21 für ein erfindungsgemäßes Multi-band-Fluoreszenz-Mikroskop mit zwei Anregungsbändern A und D dargestellt. Auf einer rechteckigen Glasplatte 27 sind ein Kurzpaß-Filter 28 zur Filterung des langwelligen Anregungsbandes A und ein Langpaß-Filter 29 zur Filterung

des kurzwelligen Anregungsbandes D als unterschiedliche Aufdampfschichten aufgebracht. Dazwischen befindet sich eine freie Öffnung 22.

Die Filter 28, 29 sind in dieser Ausführung des Filterschiebers 21 neben der freien Öffnung 22 als separate, beliebig geformte (hier kreisförmige) Flächenelemente 30 aufgedampft. Dabei nimmt die Größe der Flächenelemente 30 und damit der Anteil der bedampften Fläche des Filterschiebers 21 von der freien Öffnung 22 zu den Enden des Filterschiebers 21 zu. Neben der freien Öffnung 22 ist der Transmissionsgrad der Filter 28, 29 am größten und nimmt in Verschieberichtung zu den Enden des Filterschiebers 21 ab. An den beiden Enden des Filterschiebers 21 weisen die beiden Filter 28, 29 jeweils eine vollflächig bedampfte Fläche mit dem geringsten Transmissionsgrad auf, die mindestens den Durchmesser x der Strahlengangs hat.

In **Fig. 2d** ist ebenfalls ein Filterschieber 21 für ein erfindungsgemäßes Multi-band-Fluoreszenz-Mikroskop mit zwei Anregungsbändern A und D dargestellt. Auf einer rechteckigen Glasplatte 27 sind ein Kurzpaß-Filter 28 zur Filterung des langwelligen Anregungsbandes A und ein Langpaß-Filter 29 zur Filterung des kurzwelligen Anregungsbandes D als unterschiedliche Aufdampfschichten aufgebracht. Dazwischen befindet sich eine freie Öffnung 22.

In dieser Ausführungsform sind die Aufdampfschichten als streifenförmige Flächenelemente 30 aufgebracht, wobei die Breite der Streifen von der Mitte zu den Enden des Filterschiebers 21 zunimmt. Dadurch nimmt die Transmission in Verschieberichtung von der freien Öffnung 22 zu den Enden des Filterschiebers 21 ab. Auch hier weisen die beiden Filter 28, 29 an den beiden Enden des Filterschiebers 21 jeweils eine vollflächig bedampfte Fläche mit dem geringsten Transmissionsgrad auf, die mindestens den Durchmesser x der Strahlengangs hat.

In **Fig. 2e** sind in Abhängigkeit von der Lichtwellenlänge λ die spektralen Transmissionskurven der kurzwelligen Anregungsbandes A und des langwelligen Anregungsbandes D sowie die Transmissionskurven T_A , T_D der zugehörigen selektiven Filter, also des Langpaß-Filters für das kurzwellige Anre-

gungsband A und des Kurzpaß-Filters für das langwellige Anregungsband D, dargestellt. Die Filter A und B sind so ausgewählt, daß sie nur selektiv das jeweils zugehörige Anregungsband ausfiltern, jedoch die übrigen Wellenlängenbereiche ungehindert durchlassen.

- 5 **Fig. 3a** zeigt einen rechteckigen Filterschieber 21 eines zweiteiligen Filterschieber-Satzes 20 für ein erfindungsgemäßes Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop mit drei Anregungsbändern A, B, D. In dieser Ausführungsform besteht der Filterschieber-Satz 20 aus zwei identischen dieser rechteckigen Filterschieber 21, die dicht hintereinander neben der Aperturblendenebene 24
- 10 in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt werden.

- In der Mitte des Filterschiebers 21 ist die freie Öffnung 22 mit dem Durchmesser x des Beleuchtungsstrahlengangs 2 vorgesehen. An den beiden Enden des Filterschiebers 21 sind zwei unterschiedliche Kombinationen aus jeweils zwei der drei selektiven Filter 28, 29, 31 für die Anregungsbänder A, B, D als
- 15 Aufdampfschichten aufgebracht. Die beiden Filter 28, 31 bzw. 29, 31 an einem Ende sind jeweils so nebeneinander angeordnet, daß beide Filter aneinander und an die freie Öffnung 22 angrenzen. Jedes Filter 28, 29, 31 weist dabei einen Bereich der geringsten Transmission mit mindestens dem Durchmesser x des Beleuchtungsstrahlengangs 2 auf. Dadurch besitzt der
- 20 Filterschieber 21 an seinem kurzen Ende mindestens eine Breite von $2x$.

- Der Transmissionsgrad der Filter 28, 29, 31 nimmt in der Längsrichtung des Filterschiebers 21, also in der Verschieberichtung, von der freien Öffnung 22 zu den Enden ab. Dies ist in dem hier dargestellten Beispiel realisiert, indem die aufgedampfte Fläche jedes Filters 28, 29, 31 jeweils von der freien Öffnung 22 zum Ende des Filterschiebers 21 zunimmt.
- 25

Für jeden der beiden identischen Filterschieber 21 des Filterschieber-Satzes sind separate Verstellmittel 25 zum Verschieben des Filterschiebers 21 parallel zur Aperturblendenebene 24 sowohl in Längsrichtung als auch in Querrichtung vorgesehen. Dadurch ist es möglich, die Filter 28, 29, 31 einzeln

oder kombiniert, vollflächig oder mit nur einem Teil ihrer Fläche in den Beleuchtungsstrahlengang einzubringen.

Fig. 3b zeigt einen kreisförmigen Filterschieber 21 eines zweiteiligen Filterschieber-Satzes 20 für ein erfindungsgemäßes Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop mit drei Anregungsbändern A, B, D. In dieser vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops besteht der Filterschieber-Satz 20 aus zwei identischen dieser kreisförmigen Filterschieber 21, die dicht hintereinander neben der Aperturblendenebene 24 in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt werden. Auf jedem Filterschieber 21 ist die freie Öffnung 22 in der Mitte vorgesehen. Daran angrenzend sind als aneinander angrenzende, aufgedampfte Kreisringsektoren drei selektive Filter 28, 29, 31 für die Anregungsbänder A, B, D angeordnet.

Die Filter 28, 29, 31 besitzen jeweils einen radial abnehmenden Transmissionsgrad, der neben der freien Öffnung 22 am größten ist. Dies wird beispielsweise dadurch erzielt wird, daß die Filter 28, 29, 31 nicht vollflächig aufgedampft werden. Statt dessen sind neben der freien Öffnung 22 radial breiter zulaufende, aufgedampfte Flächenelemente 30 mit unbedampften Flächenbereichen dazwischen aufgebracht, so daß der Anteil der bedampften Fläche jedes Filters 28,29,31 radial zunimmt.

Mittels separater Verstellmittel (hier nicht dargestellt) kann jeder der beiden identischen Filterschieber 21 des Filterschieber-Satzes 20 einzeln und parallel zur Aperturblendenebene 24 verschoben werden. Er kann dabei entweder lateral in einer Richtung verschoben und zusätzlich gedreht werden (wie in der *Fig. 3b* angedeutet) oder alternativ in einer Ebene in zwei Richtungen verschoben werden. Dadurch kann jeder beliebige Flächenanteil des Filterschiebers 21, also z.B. die freie Öffnung 22 oder eines der Filter 28, 29, 31 mit dem gewünschten Transmissionsgrad, in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht werden. Durch die Anordnung zweier gleicher Filterschieber 21 im Beleuchtungsstrahlengang können zwei beliebige der drei Filter 28, 29, 31 gleichzeitig in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt werden, so daß zwei

der drei Anregungsbänder gleichzeitig auf die vorbestimmten Sollwerte abgeschwächt bzw. sogar ganz ausgeblendet werden können.

Fig. 3c zeigt eine besonders vorteilhafte Ausführungsform eines Filterschiebers 21 für einen zweiteiligen Filterschieber-Satz 20 eines erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops mit drei Anregungsbändern A, B, D. In dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops besteht der Filterschieber-Satz 20 aus zwei identischen dieser kreisförmigen Filterschieber 21, die dicht hintereinander neben der Aperturblendenebene 24 in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt werden.

10 Die Filter 28, 29, 31 für die Anregungsbänder A, B, D sind auf dem Filterschieber 21 so vorteilhaft angeordnet, daß er nur gedreht, aber nicht verschoben werden muß (Drehbewegung ist angedeutet). Das vereinfacht den Aufbau der mechanischen oder auch motorischen Verstellmittel, die jedem der beiden Filterschieber 21 separat zugeordnet sind (hier nicht dargestellt).

15 Um dies zu erreichen, ist jeder Filterschieber 21 kreisförmig aufgebaut, in sechs Sektoren gegliedert und um seine Mitte drehbar gelagert. Die Kreismitte liegt außerhalb des Beleuchtungsstrahlengangs. Jeder Sektor kann durch Drehen des Filterschiebers 21 in den Beleuchtungsstrahlengang eingeschwenkt werden und ihn voll abdecken. Der Strahlquerschnitt mit dem
20 Durchmesser x ist eingezeichnet.

Jeder zweite Sektor ist eine freie Öffnung 22. Dazwischen ist jeweils eines der drei Filter 28, 29, 31 für die drei Anregungsbänder A, B, D aufgebracht, z.B. aufgeklebt oder aufgedampft. Jedes Filter 28, 29, 31 weist innerhalb seines Kreissektors in einer der beiden Drehrichtungen einen Anstieg des Transmissionsgrads, beispielsweise durch unterschiedliche Flächenbelegung mit aufgedampften Flächenelementen, auf. Dadurch besitzt jedes Filter 28, 29, 31 neben der einen benachbarten freien Öffnung 22 einen maximalen Transmissionsgrad und neben der anderen benachbarten freien Öffnung 22 einen minimalen Transmissionsgrad. Durch Drehen des Filterschiebers 21 kann eine
25 der freien Öffnungen 22 oder eines der Filter 28, 29, 31 mit der gewünschten
30

Transmission oder eine Kombination aus beiden in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht werden. Der Einsatz von zwei identischen Filterschiebern 21 als Filterschieber-Satz ermöglicht es, bis zu zwei der drei Anregungsbänder A, B, D gleichzeitig und unabhängig von einander auf den gewünschten Sollwert zu dämpfen.

Fig. 3d zeigt in Abhängigkeit von der Lichtwellenlänge λ die spektralen Transmissionskurven des kurzwelligen Anregungsbandes A, des langwelligen Anregungsbandes D und eines dazwischenliegenden Anregungsbandes B. Weiterhin sind die Transmissionskurven T_A , T_B , T_D der zugehörigen selektiven Filter, also des Langpaß-Filters für das kurzwellige Anregungsband A, des Kurzpaß-Filters für das langwellige Anregungsband D und eines selektiven Filters für das Anregungsband B, dargestellt. Die Filter sind so ausgewählt, daß sie nur selektiv das zugehörige Anregungsband ausfiltern, jedoch die übrigen Wellenlängenbereiche ungehindert durchlassen.

Fig. 4a zeigt einen kreisförmigen Filterschieber 21 für einen dreiteiligen Filterschieber-Satz 20 eines erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops mit vier Anregungsbändern A, B, C, D. In dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops besteht der Filterschieber-Satz 20 aus drei identischen dieser kreisförmigen Filterschieber 21, die dicht hintereinander neben der Aperturblendenebene 24 in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt werden. Jeder Filterschieber 21 weist in der Mitte eine freie Öffnung 22 auf. Daneben sind als aneinander angrenzende Kreisringsektoren vier selektive Filter 28, 29, 31, 32 für die Anregungsbänder A, B, C, D aufgedampft.

Der Transmissionsgrad der Filter 28, 29, 31, 32 nimmt radial ab und ist neben der freien Öffnung 22 am größten. Dies wird beispielsweise dadurch erzielt, daß die Filter 28, 29, 31, 32 nicht vollflächig, sondern als ringförmige Flächenelemente 30 mit unbedampften Flächen dazwischen aufgedampft werden, wodurch der Anteil der bedampften Fläche jedes Filters 28, 29, 31, 32 radial zunimmt.

Jedem der drei Filterschieber 21 des Filterschieber-Satzes 20 sind separate Verstellmittel (hier nicht dargestellt) zugeordnet. Mithilfe dieser Verstellmittel kann jeder Filterschieber 21 einzeln und parallel zur Aperturblendenebene 24 verschoben werden. Er kann dabei entweder lateral in einer Richtung ver-
5 schoben und zusätzlich gedreht werden (wie in der **Fig. 4a** angedeutet) oder alternativ in einer Ebene in zwei Richtungen verschoben werden.

Dadurch kann jeder beliebige Flächenanteil des Filterschiebers 21, also z.B. die freie Öffnung 22 oder ein beliebiger Flächenanteil der Filter 28, 29, 31, 32, in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht werden. Durch die Anordnung
10 von drei gleichen Filterschiebern 21 im Beleuchtungsstrahlengang können drei beliebige der vier Filter 28, 29, 31, 32 gleichzeitig in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt werden. Damit können gleichzeitig bis zu drei der vier Anregungsbänder A, B, C, D auf die vorbestimmten Sollwerte abgeschwächt bzw. sogar ganz ausgeblendet werden.

15 **Fig. 4b** zeigt eine besonders vorteilhafte Ausführungsform eines Filterschiebers 21 für einen dreiteiligen Filterschieber-Satz 20 für ein erfindungsgemäßes Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop mit vier Anregungsbändern A, B, C, D. In dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Multiband-Fluoreszenz-Mikroskops besteht der Filterschieber-Satz 20 aus drei identischen dieser
20 kreisförmigen Filterschieber 21, die dicht hintereinander neben der Aperturblendenebene 24 in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt werden.

Die Filter 28, 29, 31, 32 für die Anregungsbänder A, B, C, D sind auf dem Filterschieber 21 so vorteilhaft angeordnet, daß er nur gedreht, aber nicht verschoben werden muß (Drehbewegung ist angedeutet). Das vereinfacht den
25 Aufbau der mechanischen oder auch motorischen Verstellmittel, die jedem der drei Filterschieber 21 separat zugeordnet sind (hier nicht dargestellt).

Dies wird dadurch erzielt, daß jeder Filterschieber 21 kreisförmig aufgebaut, in acht Sektoren gegliedert und um seine Mitte drehbar gelagert ist. Die Kreismitte liegt außerhalb des Beleuchtungsstrahlengangs. Durch Drehen des Filterschiebers 21 kann jeder Sektor ganz oder teilweise mit dem Beleuch-
30

tungsstrahlengang zur Deckung gebracht werden. Der Strahlquerschnitt mit dem Durchmesser x ist eingezeichnet.

Jeder zweite Sektor ist eine freie Öffnung 22. Dazwischen ist jeweils eines der vier Filter 28, 29, 31, 32 für die drei Anregungsbänder A, B, C, D aufgebracht, z.B. aufgeklebt oder aufgedampft. Jedes Filter 28, 29, 31, 32 weist innerhalb seines Kreissektors in einer der beiden Drehrichtungen einen Anstieg des Transmissionsgrads, beispielsweise durch unterschiedliche Flächenbelegung, auf. Dadurch besitzt jedes Filter 28, 29, 31, 32 neben der einen benachbarten freien Öffnung 22 einen maximalen Transmissionsgrad und neben der anderen benachbarten freien Öffnung 22 einen minimalen Transmissionsgrad.

Durch Drehen des Filterschiebers 21 kann eine der freien Öffnungen 22 oder eines der Filter 28, 29, 31, 32 mit der gewünschten Transmission oder eine Kombination aus beiden in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht werden. Durch den Einsatz von drei Filterschiebern 21 können bis zu drei der vier Anregungsbänder A, B, C, D gleichzeitig und unabhängig von einander auf den gewünschten Sollwert gedämpft werden.

In **Fig. 4c** sind in Abhängigkeit von der Lichtwellenlänge λ die spektralen Transmissionskurven der kurzwelligen Anregungsbandes A, des langwelligen Anregungsbandes D und zweier dazwischen liegender Anregungsbänder B und C dargestellt. Weiterhin sind die Transmissionskurven T_A , T_B , T_C , T_D der zugehörigen selektiven Filter, also des Langpaß-Filters für das kurzwellige Anregungsband A, des Kurzpaß-Filters für das langwellige Anregungsband D, eines selektiven Filters für das Anregungsband B und eines selektiven Filters für das Anregungsband C, angegeben. Die Filter A, B, C, D sind so ausgewählt, daß sie nur selektiv das jeweils zugehörige Anregungsband ausfiltern, jedoch die übrigen Wellenlängenbereiche ungehindert durchlassen.

Für mehr als vier Anregungsbänder muß der Filterschieber-Satz 20 entsprechend erweitert werden. Allerdings wird es dann zunehmend schwieriger, die einzelnen Filter nahe genug neben der Aperturblende 5 unterzubringen.

Bezugszeichenliste

- 1 Lichtquelle
 - 2 optische Achse des Beleuchtungsstrahlengangs
 - 3 Kollektor
 - 4 erstes Linsenglied
 - 5 Aperturblende
 - 6 zweites Linsenglied
 - 7 Leuchtfeldblende
 - 8 drittes Linsenglied
 - 9 Anregungsfilter
 - 10 Strahlteiler
 - 11 Objektiv
 - 12 Fluoreszenz-Objekt
 - 13 Objektisch
 - 14 Ausgangsfilter
 - 15 Tubuslinse
 - 16 Zwischenbildebene
 - 17 Okular an Tubus (17')
 - 18 Videokamera
 - 19 Bildanalyse-System
 - 20 Filterschieber-Satz
 - 21 Filterschieber (auch 21a, 21b)
 - 22 freie Öffnung
 - 23 selektive(s) Filter
 - 24 Aperturblendenebene
 - 25 Verstellmittel (25a, 25b Motoren)
 - 26 Steuerelektronik
 - 27 Glasplatte
-
- 28 Kurzpaß-Filter für das langwellige Anregungsband D(λ_4)
 - 29 Langpaß-Filter für das kurzwellige Anregungsband A(λ_1)
 - 30 Flächenelement(e)
 - 31 subtraktives Filter zu Anregungsband B(λ_2)
 - 32 subtraktives Filter zu Anregungsband C(λ_3)
 - x Strahldurchmesser in der Aperturblendenebene 24

Ansprüche

- 5 1. Verfahren zur individuellen Anpassung von Anregungsintensitäten bei einem Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop mit mehreren spektral verschiedenen Anregungsbändern, die von einem Fluoreszenz-Objekt (12) in Fluoreszenzbänder mit Fluoreszenz-Intensitäten umgesetzt werden, dadurch gekennzeichnet, daß
- 10 a) die Fluoreszenz-Intensitäten der einzelnen Fluoreszenzbänder im Mikroskopbild bestimmt und mit Intensitäts-Sollwerten größer oder gleich Null verglichen werden,
- 15 b) für jedes Anregungsband, das einer von den Intensitäts-Sollwerten abweichenden Fluoreszenz-Intensität zugeordnet ist, ein selektives Filter (23; 28, 29, 31, 32) in den Beleuchtungsstrahlengang gebracht wird,
- c) und die im Beleuchtungsstrahlengang wirksamen Transmissionsgrade der einzelnen Filter (23; 28, 29, 31, 32) stufenlos so eingestellt werden, daß durch Dämpfung der zugehörigen Anregungsbänder alle Fluoreszenz-Intensitäten auf ihre Intensitäts-Sollwerte eingestellt werden.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Sollwerte für die verschiedenen Fluoreszenz-Intensitäten alle gleich der niedrigsten Fluoreszenz-Intensität sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Sollwerte für die verschiedenen Fluoreszenz-Intensitäten gleich Null ist.
- 25 4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für einige Fluoreszenz-Intensitäten die Sollwerte gleich Null sind und für die übrigen gleich der niedrigsten Fluoreszenz-Intensität sind.

5. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
die verschiedenen Fluoreszenz-Intensitäten visuell bestimmt werden.
- 5 6. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
die verschiedenen Fluoreszenz-Intensitäten mit einem Intensitätsmesser bestimmt werden.
- 10 7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet, daß
die verschiedenen Fluoreszenz-Intensitäten mittels einer CCD- oder einer Video-Kamera (18) mit nachgeschaltetem Bildanalyse-System (19) bestimmt werden.
- 15 8. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
a) Veränderungen der Fluoreszenz-Intensitäten fortlaufend bestimmt werden,
b) und durch wiederholte Anpassung der im Beleuchtungsstrahlengang wirksamen Transmissionsgrade der Filter (23; 28, 29, 31, 32) die Fluoreszenz-Intensitäten stets wieder auf ihre Sollwerte gebracht werden.
- 20 9. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet, daß
a) Veränderungen der Fluoreszenz-Intensitäten automatisch fortlaufend bestimmt werden,
b) und durch automatisch fortlaufende Anpassung der im Beleuchtungs-
25 strahlengang wirksamen Transmissionsgrade der Filter (23, 28, 29, 31, 32) die Fluoreszenz-Intensitäten stets auf ihren Sollwerten gehalten werden.

10. Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop zur Ausübung des Verfahrens nach Anspruch 1, enthaltend einen Beleuchtungsstrahlengang mit einer Lichtquelle (1), einem Kollektor (3), mehreren Linsengliedern (4, 6, 8), einer Aperturblende (5), einer Leuchtfeldblende (7), einem Anregungsfilter (9) zur Erzeugung mehrerer Anregungsbänder unterschiedlicher Lichtwellenlängen sowie einem Filterelement zur Beeinflussung dieser Anregungsbänder, ferner enthaltend einen Strahlteiler (10) und ein Objektiv (11), das den Beleuchtungsstrahl auf ein auf einem Objektisch (13) liegendes Fluoreszenz-Objekt (12) richtet, welches über den Strahlteiler (10), einen Ausgangsfilter (14) und eine Tubuslinse (15) in eine Zwischenbildebene (16) abgebildet wird,

dadurch gekennzeichnet, daß

- a) als Filterelement ein Filterschieber-Satz (20) aus einzeln verschiebbaren, dicht beabstandeten Filterschiebern (21; 21a, 21b) dicht neben der Aperturblende (5) senkrecht in den Beleuchtungsstrahlengang eingefügt ist,
- b) auf jedem Filterschieber (21) für jedes Anregungsband ein selektives Filter (23; 28, 29, 31, 32) vorgesehen ist, das Flächenbereiche mit hohen und niedrigen Transmissionsgraden aufweist,
- c) zum vollständigen Löschen des Anregungsbandes der Flächenbereich mit dem niedrigsten Transmissionsgrad einen Minstdurchmesser gleich dem Strahldurchmesser (x) aufweist,
- d) neben jedem Filter (23; 28, 29, 31, 32) eine freie Öffnung (22) mit dem Strahldurchmesser (x) angeordnet ist,
- e) der Transmissionsgrad jedes Filters (23; 28, 29, 31, 32) in Verschieberichtung mit dem Abstand von der freien Öffnung (22) abnimmt,
- f) und jedem Filterschieber (21) separate Verstellmittel (25) zugeordnet sind, mit denen ein beliebiger Flächenbereich des Filterschiebers (21) in den Beleuchtungsstrahlengang eingebracht werden kann.

11. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 10,

dadurch gekennzeichnet, daß

zur Beeinflussung einer Anzahl n Anregungsbänder

5 a) der Filterschieber-Satz (20) aus $n-1$ Filterschiebern (21) auf separaten,
dicht beabstandeten $n-1$ Schiebe-Ebenen parallel zur Aperturblenden-
ebene (24) besteht,

b) jeder Filterschieber (21) mindestens eine freie Öffnung (22) und n selektive Filter (23; 28, 29, 31, 32) für die n Anregungsbänder aufweist.

12. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 10,

10 **dadurch gekennzeichnet, daß**

zur Beeinflussung zweier Anregungsbänder A, D ein einzelner Filterschieber (21) vorgesehen ist,

15 a) der an seinem einen Ende ein Langpaß-Filter (29) zur Intensitätsabschwächung des kürzerwelligen Anregungsbandes A,

b) an seinem anderen Ende ein Kurzpaß-Filter (28) zur Intensitätsabschwächung des längerwelligen Anregungsbandes D,

c) und dazwischen die freie Öffnung (22) aufweist,

20 d) sowie Verstellmittel (25) zum kontinuierlichen Verschieben des Filterschiebers (21) parallel zur der Aperturblendenebene (24) angebracht sind.

13. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 11,

dadurch gekennzeichnet, daß

25 a) der Filterschieber (21) eine lichtdurchlässige, rechteckige Glasplatte (27) aufweist, an deren Enden einander gegenüberliegend das Kurzpaß-Filter (28) und das Langpaß-Filter (29) als Aufdampfschichten aufgebracht sind,

30 b) und das Kurzpaß-Filter (28) und das Langpaß-Filter (29) jeweils in Verschieberichtung von der freien Öffnung (22) zu den Enden des Filterschiebers (21) einen zunehmenden Anteil der bedampften Glasoberfläche und dadurch eine abnehmende Transmission aufweist.

14. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 12,

dadurch gekennzeichnet, daß

5 die Flächen der beiden Aufdampfschichten an den Enden des Filterschiebers (21) jeweils die Form eines Rechtecks mit einer Mindestkantenlänge gleich dem Strahldurchmesser (x) haben, dem in Richtung der freien Öffnung (22) die Basis einer aufgedampften, gleichschenkligen Dreiecksfläche angrenzt.

15. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 12,

dadurch gekennzeichnet, daß

10 die Aufdampfschichten ganz oder teilweise als nicht zusammenhängende Fläche, sondern als Flächenelemente (30) aufgebracht sind, deren Größe oder Abstände in Verschieberichtung von der freien Öffnung (22) zu den Enden hin unterschiedlich gewählt sind.

16. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 10,

dadurch gekennzeichnet, daß

15 zur Beeinflussung von drei Anregungsbändern A, B, D ein zweiteiliger Filterschieber-Satz (20) aus zwei kreisförmigen Filterschiebern (21) vorgesehen ist, wobei

20 a) jeder Filterschieber (21) eine kreisförmige freie Öffnung (22) in der Mitte aufweist,

b) darum herum als drei Kreisringsektoren drei selektive Filter (28, 29, 31) für die Anregungsbänder A, B, D mit radial abnehmendem Transmissionsgrad angeordnet sind,

25 c) und jedem Filterschieber (21) separate Verstellmittel (25) zugeordnet sind, mit denen die Filterschieber (21) unabhängig voneinander parallel zur Aperturblendenebene (24) verschoben und/oder gedreht werden können.

17. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 16,

dadurch gekennzeichnet, daß

30 zur Erzielung eines radial abnehmenden Transmissionsgrads der Anteil der bedampften Fläche der Filter (28, 29, 31) radial zunimmt.

18. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 10,

dadurch gekennzeichnet, daß

zur Beeinflussung von drei Anregungsbändern A, B, D ein zweiteiliger Filterschieber-Satz (20) aus zwei kreisförmigen Filterschiebern (21) vorgesehen ist, wobei

5

a) jeder Filterschieber (21) in sechs, den Beleuchtungsstrahlengang abdeckende Kreissektoren gegliedert und um seine außerhalb des Strahlengangs gelegene Mitte drehbar gelagert ist,

10

b) jeder zweite Kreissektor eine freie Öffnung (22) ist und dazwischen jeweils eines der drei selektiven Filter (28, 29, 31) für die Anregungsbänder A, B, D liegt,

c) jedes Filter (28, 29, 31) in einer der beiden Drehrichtungen einen Anstieg des Transmissionsgrads aufweist,

15

d) und separate Verstellmittel (25) zum Drehen jedes Filterschiebers (21) um seine Mitte und parallel zur Aperturblendenebene (24) vorgesehen sind.

19. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 10,

dadurch gekennzeichnet, daß

zur Beeinflussung von drei Anregungsbändern A, B, D ein zweiteiliger Filterschieber-Satz (20) aus zwei rechteckigen Filterschiebern (21) vorgesehen ist, wobei

20

a) jeder Filterschieber (21) in der Mitte eine freie Öffnung (22) und an seinen beiden Enden zwei unterschiedliche Kombinationen aus jeweils zwei der drei selektiven Filter (28, 29, 31) für die Anregungsbänder aufweist,

25

b) der Transmissionsgrad der Filter (28, 29, 31) in der Längsrichtung des Filterschiebers (21) von der freien Öffnung (22) zu den Enden abnimmt,

30

c) und separate Verstellmittel (25) zum Verschieben des Filterschiebers (21) in Längsrichtung und parallel zur Aperturblendenebene (24) angeordnet sind.

20. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 10,

dadurch gekennzeichnet, daß

zur Beeinflussung von vier Anregungsbändern A, B, C, D ein dreiteiliger Filterschieber-Satz (20) aus drei kreisförmigen Filterschiebern (21) vorgesehen ist, wobei

5

a) jeder Filterschieber (21) in der Mitte eine freie Öffnung (22) und darum herum vier selektive Filter (28, 29, 31, 32) für die Anregungsbänder als aneinander angrenzende, aufgedampfte Kreisringsektoren mit radial abnehmendem Transmissionsgrad aufweist

10

b) und separate Verstellmittel (25) zum Verschieben und/oder Drehen jedes Filterschiebers (21) parallel zur Aperturblendenebene (24) vorgesehen sind.

21. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 10,

dadurch gekennzeichnet, daß

15

zur Beeinflussung von vier Anregungsbändern A, B, C, D ein dreiteiliger Filterschieber-Satz (20) aus drei kreisförmigen Filterschiebern (21) vorgesehen ist, wobei

20

a) jeder Filterschieber (21) in acht, den Beleuchtungsstrahlengang abdeckende Kreissektoren gegliedert und um seine außerhalb des Strahlengangs gelegene Mitte drehbar gelagert ist,

b) jeder zweite Kreissektor eine freie Öffnung (22) ist und dazwischen jeweils eines der vier selektiven Filter (28, 29, 31, 32) für die Anregungsbänder liegt,

25

c) jedes Filter (28, 29, 31, 32) in einer der beiden Drehrichtungen einen Anstieg des Transmissionsgrads aufweist,

d) und separate Verstellmittel (25) zum Drehen jedes Filterschiebers (21) um seine Mitte und parallel zur Aperturblendenebene (24) vorgesehen sind.

Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur individuellen Anpassung von Anregungsintensitäten bei einem Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop mit mehreren spektral verschiedenen Anregungsbändern und zugeordneten Fluoreszenzbändern angegeben. Die Intensitäten der einzelnen Fluoreszenzbänder im Mikroskopbild werden bestimmt und mit Intensitäts-Sollwerten größer oder gleich Null verglichen. Für jedes Anregungsband, das einer von den Intensitäts-Sollwerten abweichenden Fluoreszenz-Intensität zugeordnet ist, wird ein selektives Filter (23; 28, 29, 31, 32) in den Beleuchtungsstrahlengang gebracht und dessen Transmissionsgrad stufenlos so eingestellt, daß durch Dämpfung des Anregungsbandes die zugeordnete Fluoreszenz-Intensität auf ihren Intensitäts-Sollwert eingestellt wird. Ein Multiband-Fluoreszenz-Mikroskop zur Durchführung des Verfahrens weist dicht neben der Aperturblende (5) einen Filterschieber-Satz (20) aus einzeln verschiebbaren, dicht beabstandeten Filterschiebern (21; 21a, 21b) mit selektiven Filtern (23; 28, 29, 31, 32) mit kontinuierlich einstellbarem Transmissionsgrad für jedes Anregungsband und mit mindestens einer freien Öffnung (22) auf. Es werden verschiedene vorteilhafte Ausgestaltungen des Filterschieber-Satzes (20) angegeben.

(Fig. 1)

Fig.1







